

EP 981 5770

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 1 8 NOV. 1998	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Hoechst Aktiengesellschaft in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) zur Produktion biogener Wertstoffe"

am 19. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 12 P und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 17. April 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Sieg

Aktenzeichen: 197 41 489.3

Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) zur Produktion biogener Wertstoffe

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) zur Produktion biogener Wertstoffe, bei dem die die biogenen Wertstoffe enthaltende Biomasse durch kontinuierlichen (permanenten) Zellaustrag gewonnen werden.

Die biotechnologische Nutzung von Ciliaten - einer Klasse der Protozoen - ist bisher nur ansatzweise realisiert, obwohl zahlreiche Stoffwechselprodukte dieser Organismen von wirtschaftlichem Interesse sind, z. B. lysosomale Enzyme. Derzeit sind nur wenige biotechnologische Verfahren zur Gewinnung von biogenen Wertstoffen aus Ciliaten beschrieben, -- vorwiegend für das Ciliat *Tetrahymena* (Kiy & Tiedtke, 1991, Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 14; Kiy et al., 1996, Enzyme Microb. Technol., 18, 268; Kiy & Tiedtke, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 141), -- und es handelt sich hierbei ausschließlich um Verfahren zur Gewinnung von ausgeschiedenen Zellprodukten, d. h. von solchen Zellprodukten, die von den Ciliatenzellen ins Kulturmedium abgegeben werden. Bei dieser Art von Verfahren werden die Ciliaten in Fermentern kultiviert und das die ausgeschiedenen biogenen Wertstoffe enthaltende Kulturmedium wird periodisch, in mehr oder weniger regelmäßigen Zeitabständen, abgenommen und gegen frisches Medium ausgetauscht. Während des Mediumaustauschs werden die Ciliaten über bestimmte Verfahren -- z. B. den Einsatz von Membranen, eine Zellimmobilisierung o. ä. -- im Fermenter zurückgehalten, so daß praktisch kein Zellmaterial verloren geht und die Zellkultur im Prinzip permanent fortbesteht.

Zur Gewinnung von biogenen Wertstoffen, die zellgebunden vorliegen, ist es jedoch nötig, die gesamten Zellen, die sog. Biomasse, zu ernten. Zu diesem Zweck wird in der Regel -- d. h. bei den allgemein bekannten Fermentationsverfahren mit Bakterien oder Pilzen als Wertstoffproduzenten -- eine sog. Batch-Fermentation durchgeführt, bei der

der Fermenter angeimpft wird und die Zellen solange kultiviert werden, bis sie die maximale Zelldichte bzw. Biomasse erreicht haben. Dann wird diese Biomasse geerntet. Derartige Verfahren sind auch bereits für verschiedene Ciliaten wie *Paramecium*, (*Volvox* und *Tetrahymena*) beschrieben worden (Proper & Garver, 1966, Biotechnol. Bioeng., 8, 287; Schonefeld et al., 1986, J. Protozool., 33, 222; Kiy & Tiedtke, 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 576).

Die Batch-Fermentations-Verfahren haben jedoch den grundsätzlichen Nachteil, daß sie ein intervallmäßiges Reinigen, neues Animpfen des Fermenters und eine intensive Überwachung und Pflege der Zellkultur - vor allem während der kritischen Anwuchsphase - erfordern.

Aus der Fermentationstechnik mit Bakterien oder Hefen als Wertstoffproduzenten ist neben dem Batch-Fermentationsverfahren auch das "kontinuierliche Fermentationsverfahren" bekannt. Bei diesem Verfahren werden die Zellen im Fermenter bis zu einer bestimmten Zelldichte gezüchtet und dann ständig durch kontinuierlichen Zellaustrag aus dem Fermenter geerntet während gleichzeitig im selben Umfang frisches Kulturmedium zugeführt wird. Die pro Zeiteinheit entnommene Zellmenge (der Zellaustrag) ist so bemessen, daß die im Fermenter verbleibenden Zellen die durch die Ernte bedingte Abnahme der Zelldichte durch kontinuierliche Zellteilungen mühelos wieder ausgleichen können. Im Bereich einer bestimmten Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate "D" bleibt die Zelldichte im Fermenter somit konstant, obwohl kontinuierlich Biomasse und damit das gewünschte Produkt geerntet wird.

Prinzipiell ist dieses kontinuierliche Fermentationsverfahren einer Batch-Fermentation ökonomisch weit überlegen, aber seine Durchführung setzt voraus, daß die kultivierten bzw. gezüchteten Organismen relativ schnell und gleichmäßig wachsen und sich vermehren, und daß sie unempfindlich gegen die Rühr- und Scherkräfte sind, die bei einem kontinuierlichen Fermentationsverfahren auftreten.

Von Ciliaten ist hingegen allgemein bekannt, daß sie häufig nur sehr langsam wachsen und sich vermehren, daß sie unterschiedliche Wachstumsphasen durchlaufen, und daß sie sehr empfindlich auf Ruhr- und Scherkräfte reagieren (Curds & Cockburn, 1971, Journal of General Microbiology 66: 95-109, Mittler & Finn, 1966, Biotechnology and Bioengineering 8: 71-84). Zwar sind auch schon Versuche zur kontinuierlichen Massenkultivierung von Ciliaten beschrieben worden, aber ausschließlich unter Verwendung von bakterienhaltigen Kulturmedien und mit Ergebnissen zur maximalen Zelldichte von wenigen Zehntausend Zellen pro ml trotz 10 Tagen Kultivierung und langer (Curds & Cockburn, a.a.O.)

Solche Zelldichten sind für einen Einsatz im großtechnischen, industriellen Maßstab völlig unzureichend. Darüberhinaus ist die von Curds & Cockburn beschriebene Kultivierung auch deshalb für einen großtechnischen Einsatz gänzlich ungeeignet, weil sie die Verwendung von beuteorganismen-, nämlich bakterienhaltigem Medium vorschreibt. Bei einem bakterienhaltigen Kulturmedium kommt es selbstverständlich auch zu einer ständigen Weitervermehrung der Bakterien, und zwar im Umfang abhängig davon, wieviele Ciliaten vorhanden sind. Das Koexistenzgleichgewicht von Ciliatenpopulation und Bakterienpopulation ist sehr labil, und schon ein geringfügiger Eingriff kann gravierende Veränderungen bei beiden Populationen hervorrufen.

Die Versuche von Curds & Cockburn liegen überdies mehr als 25 Jahre zurück und haben die Fachwelt offensichtlich in ihrer Meinung bestärkt, daß Ciliaten für ein kontinuierliches Fermentationsverfahren im großtechnischen Maßstab nicht geeignet sind.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur kontinuierlichen Fermentation durch Ciliaten mit Zellausatz bereitzustellen, bei dem die genannten Nachteile vermieden sind und das insbesondere für den großtechnischen, industriellen Einsatz gut geeignet ist.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens der Eingangs genannten Art, bei dem die Ciliatenzellen in komplexem, axenischem Medium - frei von lebenden Futter- bzw. Beuteorganismen - kultiviert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß ein kontinuierliches Fermentationsverfahren mit Zellausatz unter Verwendung komplexer, axenischer Medien auch mit reinen Ciliatenkulturen erfolgreich und wirtschaftlich außerordentlich rentabel durchführbar ist. Kontinuierliche Zelldichten in der

Größenordnung von 1 Millionen Zellen pro ml sind ohne weiteres realisierbar, im Fall von *Tetrahymena* bereits ab dem dritten Tag nach Beginn der Kultivierung. Damit ist das Vorurteil der Fachwelt überwunden, daß Ciliaten für eine kontinuierliche Massenkultivierung mit Zelldichten von mehreren Hunderttausend bis Millionen Zellen pro ml unter Einsatz von bekannten Fermentern und in Gegenwart der üblicherweise auftretenden Scherkräfte, in axenischem Medium - d.h. ohne lebende Futter- bzw. Beuteorganismen - nicht geeignet sind, weil

- sie zu langsam und zu ungleichmäßig wachsen,
- sie nur geringe Widerstandskräfte gegen Ruhr- und Scherkräfte haben und sehr leicht und schnell durch solche Kräfte geschädigt bzw. zerstört werden, und
- bei den bisherigen Kultivierungsversuchen trotz Verwendung von Beuteorganismenhaltigem Medium und damit weitgehend naturgetreuem Nahrungsangebot nur verhältnismäßig sehr geringe maximale Zelldichten erreicht wurden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es erstmals möglich, Ciliaten zur großtechnischen Produktion von zellgebundenen biogenen Wertstoffen einzusetzen und damit insbesondere solche Wertstoffe, die nur von Ciliaten bekannt sind, wie z.B. Taurolipide und Tetrahymanol, oder die speziell von Ciliaten in großem Umfang gebildet werden, wie z.B. Gamma-Linolensäure und Arachidonsäure, in wirtschaftlich bedeutendem Umfang zu gewinnen.

Da die Ciliaten als Reinkultur - d.h. frei von anderen lebenden Organismen - gehalten werden, sind wesentliche Störfaktoren von vorne herein vermieden, und auch der

technische Aufwand ist auf ein Mindestmaß beschränkt: Fermenter zur Nachzucht der Beuteorganismen sind beispielsweise vollständig entfallen.

Zu den Produkten, die aus der ausgetragenen Biomasse gewonnen werden können, gehören Peptide und Proteine, vor allem Enzyme (z. B. β -Hexosaminidase, L-Asparaginase, Diisopropylfluorophosphatase, Glucosidase, Fucosidase, Phosphatase, Nuklease oder 'athepsin I'), Fettsäuren und Lipide (z. B. Gamma-Linolensäure, Arachidonsäure, Phosphonolipide, Taurilipide, oder Tetrahydromanol), Polysaccharide, Nukleinsäuren, Sekundärmetabolite, Polymerer, u. a.

Auch die Biomasse als solche kann das Produkt sein.

Die Gruppe der Ciliaten, die sich mittels des beschriebenen Verfahrens kultivieren lassen, umfaßt alle taxonomischen Ciliaten-Untergruppen, die sich prinzipiell in konventionellen Stand- und/oder Schüttelkulturen bzw. Batch-Fermentationen auf axenischen Nährmedien bzw. Nährmedien, die als Nährstoff abgetötete Biomasse eines Futterorganismus enthalten, kultivieren lassen. Dies sind insbesondere die Ciliatenunterklassen *Holotricha*, *Peritricha*, *Spirontiricha* und *Suctorina* und ganz besonders deren Vertreter *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Colpoda*, *Gilaucoma* und *Colpidium* (Klassifizierung nach K. Hausmann: Protozoologie, Thieme Verlag, 1985).

Die Erfindung ist auch nicht auf Wildstämme beschränkt, sondern schließt Mutanten und rekombinante Stämme ein.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Fermentation in einem Kultur-, oder Blasensäulen- oder Airliftfermenter durchgeführt.

Während der Fermentation kann der pH-Wert reguliert werden, vorzugsweise auf einen Wert im Bereich von pH 4 bis pH 9.

Die Fermentationstemperatur liegt je nach Ciliatenspezies zwischen 15 und 40° C.

Als Kohlenstoff-Quelle wird vorzugsweise wenigstens eine der nachfolgend aufgelisteten Substanzen verwendet, nämlich: Glucose, Fructose, Xylose, Saccharose, Maltose,

Stärke, Fucose, Glucosamin, Lactose, Melasse, Dextran, Fettsäuren (z. B. Ölsäure), Sojaöl, Sonnenblumenöl, Glycerin, Glutaminsäure, Mannitol, Magermilchpulver oder Acetat.

Die Konzentration der Kohlenstoff-Quelle sollte zwischen 0,2 und 20 Gewichts-%, bezogen auf das Kulturmedium, liegen.

Als Stickstoff-Quelle wird vorzugsweise wenigstens eine der nachfolgend aufgelisteten Substanzen verwendet, nämlich: Peptone, Hefeextrakt, Malzextrakt, Fleischextrakt, Magermilchpulver, Casamino Acid, Corn Steep Liquor, organische Stickstoff-Quellen wie Na-Glutamat und Harnstoff, anorganische Stickstoff-Quellen wie Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid oder Ammoniumnitrat.

Die Konzentration der Stickstoff-Quelle sollte zwischen 0,1 und 10 Gewichts-%, bezogen auf das Kulturmedium, liegen.

Bei einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem Kulturmedium wenigstens eine Phosphatquelle, z. B. Kaliumphosphat oder Kalium-Dihydrogenphosphat, zugesetzt. Alternativ oder kumulativ kann auch Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Magnesium, Eisen, Kupfer, Calcium, Vitamine, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren zugesetzt werden, um die Wachstums- und Vermehrungsrate der betreffenden Ciliatenkultur weiter zu optimieren.

Die kontinuierlich geerntete Biomasse wird vom Kulturmedium vorzugsweise mittels Zentrifugation, Tangentialfiltration, Mikrofiltration, Sedimentation, Flotation oder Separatoren abgetrennt. Andere Methoden sind aber ebenfalls denkbar.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt die Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate D (= täglich ausgetauschtes Volumen / Arbeitsvolumen des Fermenters) im Bereich von 0,1 bis 12 (= 1/10 bis 12/1) — je nach Wachstumsrate des Ciliatenstammes.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführung: Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1: Kontinuierliche Fermentation von *Tetrahymena pyriformis*

Tetrahymena pyriformis wurde in einem 2-l Fermenter des Typs Biostat MD (Braun Biotech, Melsungen) unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Medium:

Wasser mit Zusätzen von

- 0,5 Gewichts-% Proteose Pepton
- 0,1 Gewichts-% Hefeextrakt
- 3 Gewichts-% flüssiger Starkezucker
- 1 ml/l Eisenspur

Fermentationsbedingungen

- Temperatur: 30 °C
- Sauerstoffsättigung: 20 %
- pH-Regulierung: pH 7
- Start (t_{0h}): Inokulum 50 000 Zellen / ml, Kultivierung nach Batch-Verfahren-Art
- Beginn der kontinuierliche Fermentation: t_{5h} mit $D = 1$.
- Fortsetzung der kontinuierliche Fermentation: ab t_{78h} mit $D = 1,5$; ab t_{98h} mit $D = 2,4$

Zu Beginn der Kultivierung wurde das Medium mit etwa 50 000 Zellen angereicht und diese Starterkultur nach Art eines Batch-Verfahrens so lange kultiviert, bis die Zellpopulation am Ende der Vermehrungsphase und kurz vor dem Eintritt in die stationäre Phase stand. Zu diesem Zeitpunkt im vorliegenden Beispiel 51 Stunden nach der Animpfung (t_{51h}) wurde auf kontinuierliche Fermentation umgestellt, d.h. von da an wurde kontinuierlich zellhaltiges Medium abgenommen und die entsprechende Menge zellfreies Medium zugeführt. Zu Beginn der kontinuierlichen Fermentation betrug die Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate (= Volummenge an täglich ausgetauschtem Medium pro Arbeitsvolumen des Fermenters) $D=1$, d.h. pro Tag wurde der gesamte

Inhalt des Fermenters (2 l) einmal ausgetauscht und 2 l Ciliaten-haltiges Medium gewonnen. Dieses Medium enthielt etwa 1 Millionen Zellen pro ml

27 Stunden nach Beginn der kontinuierlichen Fermentation (= 78 Stunden nach der Animpfung = t_{78h}) wurde die Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate auf $D=1,5$ erhöht, d.h. pro Tag wurden ab diesem Zeitpunkt etwa 3 l Ciliaten-haltiges Medium gewonnen.

Die Zelldichte blieb dabei praktisch unverändert bei etwa 1 Millionen Zellen pro ml

Nach weiteren 20 Stunden (= 98 Stunden nach der Animpfung = t_{98h}) wurde die

Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate nochmals erhöht auf $D=2,4$, d.h. pro Tag

wurden etwa 5 l Ciliaten-haltiges Medium gewonnen, wobei die Zelldichte nach wie vor praktisch unverändert bei etwa 1 Millionen Zellen / ml lag.

Die Ergebnisse dieses Fermentationsprozesses sind in Abb. 1 graphisch dargestellt. Aus dem dort abgebildeten Kurvenverlauf ist ersichtlich, daß es trotz kontinuierlichem Zellaustrag zu keiner Ausverdünnung kam, sondern eine ständige und kontinuierliche Vermehrung der Ciliaten stattfand. Mit anderen Worten: die Kultur befand sich auch bei größerem Zellaustrag ($D=2,4$) immer in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Zellaustrag und Zellvermehrung.

Beispiel 2: Kontinuierliche Fermentation von *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila wurde in einem 2-l Fermenter des Typs Biostat MD (Braun

Biotech, Melsungen) unter folgenden Bedingungen kultiviert:

Medium:

Wasser mit Zusätzen von

- 5 g/l Proteose Pepton
- 1 g/l Hefeextrakt
- 1 ml/l Eisenspur
- 1 Gewichts-% Glucose in Form von flüssigem Starkezucker

Fermentationsbedingungen:

- Temperatur: 30° C
- Sauerstoffsättigung: 20 %
- pH-Regulierung: pH 7
- Start (t_{0h}): Inokulum 50.000 Zellen / ml, Kultivierung nach Batch-Verfahren-Art
- Beginn der kontinuierliche Fermentation: t_{48h} mit $D = 1,2$.
- Fortsetzung der kontinuierliche Fermentation: ab t_{178h} mit $D = 2,4$; ab t_{198h} mit $D = 3$

Das Verfahren wurde im Prinzip wie unter Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

In Abb 2 ist das Wachstums- bzw. Vermehrungsverhalten der Cilienpopulation unter den genannten Fermentationsbedingungen graphisch dargestellt. Aus dem abgebildeten Kurvenverlauf ist erkennbar, daß die Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate von $D = 1,2$ auf $D = 2,4$ (Verdoppelung) zu einer Abnahme der Zelldichte von etwa 1 Millionen Zellen/ml auf etwa 500.000 Zellen/ml (Halbierung) führte, daß diese Zelldichte dann aber relativ konstant blieb und nicht weitere abnahm, selbst bei einer weiteren Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate von $D = 2,4$ auf $D = 3$.

Beispiel 3: Kontinuierliche Fermentation von *Tetrahymena thermophila*

Medium:

- Wasser mit Zusätzen von
- 20 g/l Magermilchpulver
- 10 g/l Glucose
- 5 g/l Hefeextrakt
- 1 ml/l Eisenspur

Fermentationsbedingungen:

- Temperatur: 30° C
- Sauerstoffsättigung: 20 %

- Rührer: als 2. Kaskade für Sauerstoffregulation
- pH-Regulierung: pH 7
- Start (t_{0h}): Inokulum 50.000 Zellen / ml, Kultivierung nach Batch-Verfahren-Art
- Beginn der kontinuierliche Fermentation: t_{30h} mit $D = 1,125$.
- Fortsetzung der kontinuierliche Fermentation: ab t_{68h} mit $D = 1,9$;
ab t_{136h} mit $D = 4,14$;
ab t_{168h} mit $D = 4,94$

Das Verfahren wurde im Prinzip wie unter Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

In Abb. 3 ist das Wachstums- bzw. Vermehrungsverhalten der Cilienpopulation unter den vordringend genannten Fermentationsbedingungen graphisch dargestellt. Der abgebildete Kurvenverlauf zeigt, daß es zu Beginn der kontinuierlichen Fermentation zu einer Abnahme der Zelldichte von anfänglich etwa einer Millionen Zellen pro ml auf etwa 600.000 Zellen pro ml kam. Die Zellpopulation erholte sich aber wieder trotz einer Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate innerhalb von 1,5 Tagen (etwa 36 Stunden), und hatte etwa 4 Tage (90 Stunden) nach Beginn der kontinuierlichen Fermentation wieder ihre Ausgangsdichte von 1 Millionen Zellen pro ml erreicht. Dieser Wert wurde auch bei weiterer Steigerung der Zellaustrags- bzw. Verdünnungsrate auf $D = 4,1$ und schließlich auf $D = 4,9$ nicht mehr unterschritten.

In der unteren Kurve in Abb. 3 sind die Ergebnisse von Bestimmungen des Trockengewichts der Zellen (in g pro l) während der Kultivierungsdauer dargestellt. Aus dem im wesentlichen parallel zur Zellvermehrungskurve verlaufenden Kurvenverlauf ist erkennbar, daß die Zellvermehrung nicht auf Kosten der Zellgröße bzw. des Zellvolumens der einzelnen Cilienzellen erfolgt, sondern daß tatsächlich entsprechend mehr Biomasse produziert wird.

10. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium eine oder mehrere der folgenden Substanzen enthält:

Ammoniumsulfat, Natriumsulfat, Magnesium, Eisen, Kupfer, Calcium, Vitamine, Spurenelemente

11. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium abgetotete Biomasse von Futterorganismen der Ciliaten enthält

12. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die im Zellaustrag enthaltenen Zellen (= geerntete Biomasse) mittels Zentrifugation und/oder Tangentialfiltration und/oder Mikrofiltration und/oder Sedimentation und/oder Flotation vom Kulturmedium abgetrennt wird

13. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellaustragsrate bzw. Verdünnungsrate (= täglich ausgetauschtes Volumen / Arbeitsvolumen des Fermenters) einen Wert im Bereich von 0,1 bis 12 beträgt

14. Fermentationsverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die biogenen Wertstoffe eine oder mehrere Substanz(en) aus der Gruppe, bestehend aus: Peptiden und Proteine, insbesondere Enzymen, Fettsäuren und Lipide, Polysaccharide, Nukleinsäuren, Sekundärmetabolite und Polymere, sind

Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) zur Produktion biogener Wertstoffe

ZUSAMMENFASSUNG

Bei dem erfindungsgemäßen Fermentationsverfahren mit kontinuierlicher Massenkultivierung von Ciliaten (Protozoa) werden die Ciliatenzellen in komplexem, axenischem Medium – frei von lebenden Futter- bzw. Beuteorganismen – kultiviert, und die die gewünschten biogenen Wertstoffe enthaltende Biomasse wird durch kontinuierlichen (permanenten) Zellaustrag gewonnen

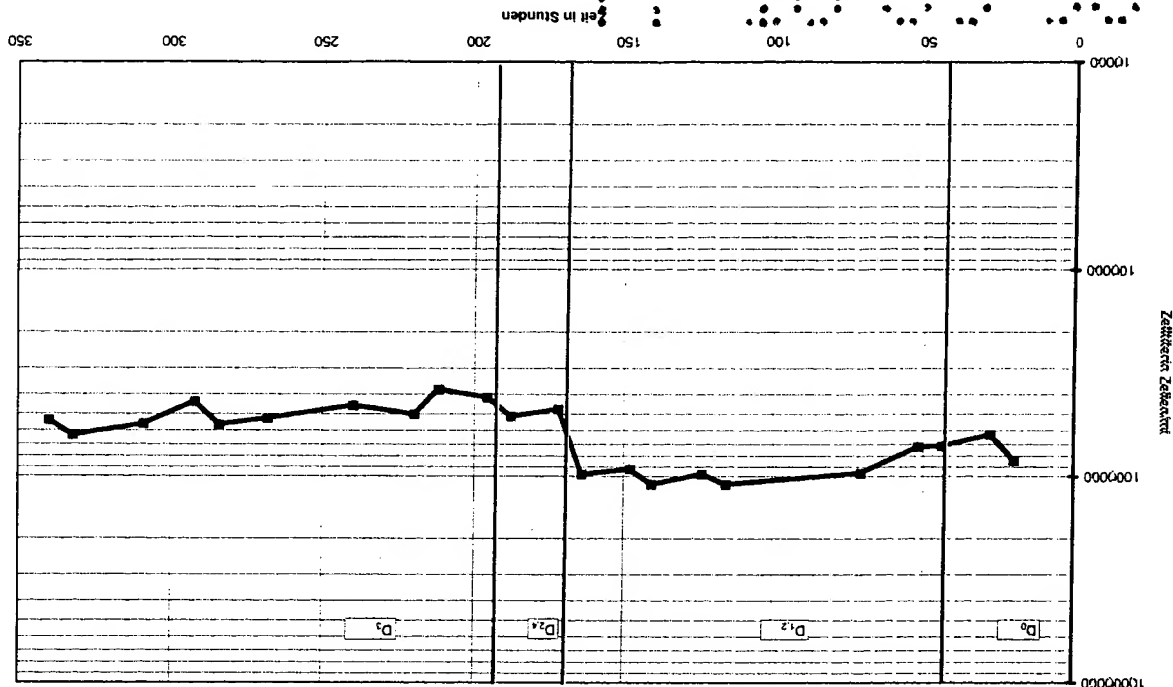
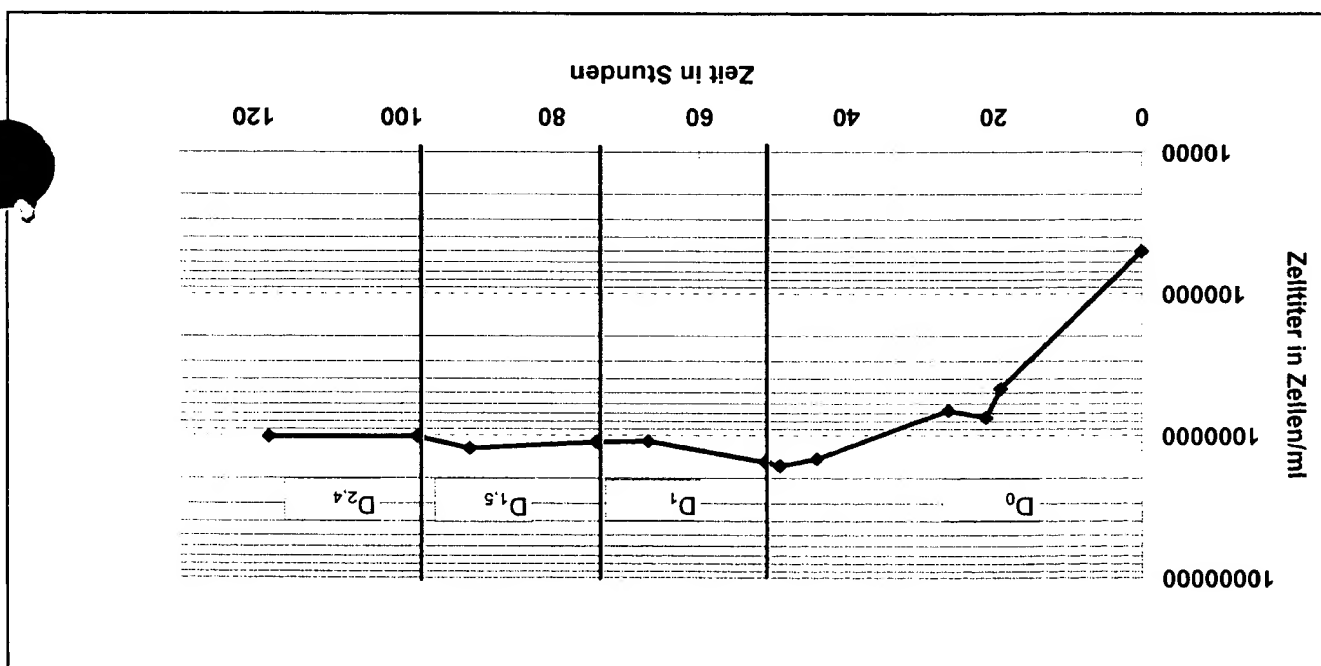


Abb. 1



M 10.09.93

Abb.3

